



19 FEDERAL REPUBLIC
OF GERMANY



GERMAN PATENT
AND TRADEMARK OFFICE

12 Unexamined Patent
Application
10 DE 101 32 147 A1

51 Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/04
// (C12Q 1/68,C12R
1:01)

DE 101 32 147 A1

21 Application number: 101 32 147.3
22 Filing date: July 3, 2001
43 Date laid open for
public inspection: February 6, 2003

71 Applicant:
Universität Leipzig, 04109 Leipzig, DE

74 Representative:
Nenning, P., Dipl.-Chem. Dipl.-Jur. Dr.rer.nat. Dr.jur.,
04275 Leipzig

72 Inventor:
Eschrich, Klaus, Prof. Dr., 04277 Leipzig, DE; Rupf,
Stefan, Dr., 04275 Leipzig, DE

The following information is taken from documents filed by the applicant.

Application for examination in accordance with §44, German Patent Act has been filed.

54 Method for rapid quantitative determination of eubacteria



⑩ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑬ DE 101 32 147 A 1

⑮ Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/04
// (C12Q 1/68,C12R
1:01)

⑰ Anmelder:
Universität Leipzig, 04109 Leipzig, DE

⑯ Vertreter:
Nenning, P., Dipl.-Chem. Dipl.-Jur.Dr.rer.nat.Dr.jur.,
04275 Leipzig

⑰ Erfinder:
Eschrich, Klaus, Prof. Dr., 04277 Leipzig, DE; Rupf,
Stefan, Dr., 04275 Leipzig, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verfahren zur schnellen quantitativen Bestimmung von Eu-Bakterien

DE 101 32 147 A 1

DE 101 32 147 A 1

DE 101 32 147 A 1

Beschreibung

- [0001] Die Erfahrung betrifft ein schnelles, kostengünstiges Verfahren zur Bestimmung der Gesamtzahl von Eubakterien sowie der Anzahl von Eubakterien einzelner Spezies.
- 5 [0002] Es ist bereits bekannt, Eubakterien nachzuweisen und ihre Zahl zu erfassen. Im allgemeinen erfolgt dabei keine Differenzierung der Bakterienspezies. Diese ist nur mittels spezifischer weiterer, parallel oder nachfolgend durchgeführter Ansätze möglich. So hat das Kultivieren von Eubakterien auf Nährmedien den Nachteil, daß viele Bakterienarten gar nicht angesprochen und zum Wachstum veranlaßt werden. Die Ursache liegt in der mangelnden Eignung der verfügbaren Nährmedien. Viele Bakterienarten wachsen nur recht und schlecht, was auch auf die bisher unzureichende Erforschung 10 der Kultivierungsbedingungen für viele Bakterien zurückzuführen ist.
- [0003] Für die quantitative Erfassung einzelner Bakterienspezies ist weiterhin die Unspezifität der Nährmedien nachteilig. Mehrere Keimspezies wachsen mit ähnlicher Intensität und verhindern eine Differenzierung. Es können auch nicht alle gewünschten Spezies erfaßt werden, weil eben nur lebende, unbeschädigte Zellen wachsen, während die anderen aus einem Nachweis herausfallen. Dazu kommt, daß die Stoffwechselprodukte der einen Spezies das Wachstum der anderen 15 stören können, so daß eine weitere Meßergebnisverfälschung Platz greift.
- [0004] Nachteilig sind auch Zeitbedarf und Kosten. Der Zeitbedarf resultiert aus der gegebenen Geschwindigkeit der Zellvermehrung, die Kosten aus der Notwendigkeit der Verwendung spezieller Substrate, dem Einhalten spezifischer Kulturbedingungen und der Pflege der Kulturen, die apparativen und personellen Aufwand erfordert.
- 20 [0005] Ein Teil der Bakterien darf aus Gründen erlassener Vorschriften nur mit Testkits untersucht werden. Diese sind teuer. Der Ausweg wäre das Durchführen der Arbeiten in einem zertifizierten Labor. Das ist noch teurer und für Routineuntersuchungen nicht mehr denkbar.
- [0006] Es ist weiterhin bekannt, Eubakterien durch Phasenkontrast- und/oder Dunkelfeldmikroskopie nachzuweisen und zu bestimmen.
- 25 [0007] Das hat aber den Nachteil, daß die Identifizierung subjektiv verfälscht ist. Ursache dafür ist die Beurteilung des Gesichtsfeldes im Mikroskop durch einen zwar erfahrenen Mikrobiologen, der aber doch auf visuelle Weise arbeitet mit den daraus resultierenden Fehlerquellen. Auf diese Weise können Gruppen von Bakterienspezies identifiziert werden, meist keine einzelnen Arten. Der Grund ist in der habituellen Ähnlichkeit der Untersuchungsobjekte zu sehen. Nachteilig ist weiterhin, daß der Analyt nur im status quo untersucht werden kann. Das kommt daher, daß unter den Analysebedingungen die Bakterien nicht wachsen können.
- 30 [0008] Weiterhin sind Arbeiten bekannt geworden, Eubakterien über ihre Stoffwechselprodukte zu identifizieren. Allerdings sind viele Bakterien so nicht zu erfassen. Das liegt daran, daß nur eine begrenzte Anzahl von Stämmen und Arten spezifisch nachweisbare Stoffwechselprodukte freisetzt. Dies wiederum führt dazu, daß Gruppen von Bakterien falsch positiv erfaßt werden, weil verwandte Arten auch ähnliche Stoffwechselprodukte ausscheiden. Und eine Quantifizierung der Bakterien über ihre Stoffwechselprodukte ist gleich gar nicht möglich, weil die Intensität des Stoffwechsels 35 weder steuerbar noch reproduzierbar ist.
- [0009] Es ist darüber hinaus bekannt, Eubakterien mit immunologischen Methoden nachzuweisen. Diese Methoden sind teuer. Ursache ist das notwendige Verwenden polyklonaler Antiseren oder monoklonaler Antikörper, die nur unter hohem Zeit- und Mitteleinsatz selbst herzustellen oder teuer zu erwerben sind. Diese Methoden haben sich daher nicht 40 allgemein durchsetzen können. Eine Quantifizierung einzelner Bakterienspezies mittels immunologischer Methoden ist nur bedingt möglich, da die Expression von Antigenen starken Schwankungen unterliegen kann. Für eine Erfassung der Gesamtbakterienzahl eignen sich immunologische Verfahren wegen der hohen Spezifität der Antikörper prinzipiell nicht.
- 45 [0010] Schließlich sind nukleinsäurebasierte Methoden bekannt. Diese werden in Hybridisierungsmethoden und in Polymerasekettenreaktion (PCR)-Verfahren unterschieden. Die Hybridisierungsmethoden setzen die Kenntnis geeigneter, meist mehrere hundert Basenpaare langer Zielsequenzen voraus. Bisher zeigt sich, daß die erreichte Sensitivität der Hybridisierungsverfahren unzureichend ist. Die Ursache liegt darin, daß nur die gerade vorhandene Zahl von Bakterien nachgewiesen wird und keine Vermehrung des Analyten geschieht. Die bisher eingesetzten sekundären Verstärkungsmittel sind störanfällig und verhindern letztlich eine ausreichend genaue Quantifizierung. Hohe Sensitivität ist nur durch radioaktive Methoden zu erreichen. Die Begleitumstände aber sind eine aufwendige Methodik und Schwierigkeiten bei der 50 Entsorgung der radioaktiven Abfälle.
- 55 [0011] Die PCR setzt die Kenntnis zweier kurzer, in geeignetem Abstand (100 bis 2000 Basenpaare) voneinander entfernter Sequenzen für die Primerbindung voraus. Sie ist, neben der Kultivierung, die einzige Keimnachweismethode, bei der eine Vermehrung des Analyten erfolgt. Der Keimnachweis erfolgt über die Amplifikation der Zielsequenz (Template). Die PCR ist primär eine qualitative Methode. Zwischen Template- und Produktmenge besteht ein extrem nichtlinearer, von zahlreichen, experimentell schwer kontrollierbaren Einflußgrößen bestimmter Zusammenhang. Daher erlaubt die PCR beim Bakteriennachweis nur eine ja/nein-Antwort, bestenfalls eine halb-quantitative Abschätzung der Keimmengen, jedoch keine Quantifizierung. Die Kombination von hoher Sensitivität und fehlender Quantifizierbarkeit führt leicht zu falsch-positiven Ergebnissen. Damit ist die PCR für den Nachweis von Bakterien oft zu empfindlich und hat sich deshalb bisher in der Praxis nicht durchsetzen können. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren (Hemmstoffen der 60 Taq-Polymerase) in den zu untersuchenden Proben führt zu einer verringerten Sensitivität bis hin zu falsch-negativen Ergebnissen. Nur hochreine DNA ist mit Sicherheit frei von PCR-Hemmstoffen. Proben aus Medizin, Umwelt oder Biotechnologie enthalten oft PCR-Hemmstoffe (z. B. Blut, Eiter, Schwermetallionen). Durch Reinigungsschritte können ebenfalls Hemmstoffe der PCR in die Probe gelangen. Auch kann man nie sicher sein, das verfügbare kommerzielle Reinigungs-Kits dieses Problem lösen und alle Hemmstoffe beseitigen bzw. keine neuen hinzufügen. Das Problem wird einziger von Methoden der kompetitiven PCR gelöst, bei denen der Probe eine zur bakteriellen Zielsequenz homologe oder heterologe Kompetitor-DNA zugesetzt wird. Bei annähernd gleicher Amplifikationseffizienz kann aus dem Verhältnis der Amplifikationsmengen von Probe und Kompetitor auf das Verhältnis der eingesetzten Templatemengen, und aus der bekannten KompetitorTemplatemenge auf die Probentemplatemenge geschlossen werden. Kompetitive PCR ist damit ein

DE 101 32 147 A 1

- weniger störanfälliges und echt quantitatives Verfahren zur DNA-, und damit auch zur Bakterienbestimmung.
- [0012] Klassische qualitative und quantitative PCR-Methoden sind zeitaufwendig. Dies betrifft sowohl die DNA-Amplifikation als auch den Nachweis bzw. die Quantifizierung der PCR-Produkte, die z. B. durch Agarosegelektrophorese, Ethidiumbromidanfärbung und Videodensitometrie erfolgen. Für Bakterien nachweise und -quantifizierungen, deren Ergebnisse aus medizinischen oder, bei biotechnologischen Analysen, prozeßtechnologischen Gründen möglichst schnell vorliegen müssen, ist der Zeitbedarf von mindestens einem Arbeitstag oft unakzeptabel. 5
- [0013] Es existieren Verfahren der "real time"-PCR, bei denen dem PCR-Ansatz ein geeigneter Fluoreszenzfarbstoff, z. B. SYBR Green I, zugesetzt und die Entstehung der Amplifikate während der PCR mittels fluoreszenzoptischer Verfahren bereits während der PCR verfolgt wird. Damit entfällt die der PCR nachgelagerte Analytik oder wird stark vereinfacht. Im Falle des LightCycler der Firma Roche Diagnostics ist auch die PCR deutlich schneller als auf Blockthermocyclern, weil in Glaskapillaren amplifiziert wird, die einen schnelleren Wärmeübergang erlauben als die sonst üblichen Plastikröhren. 10
- [0014] Neben dem Nachweis über SYBR Green I (Wittwer et al., 1997) ist beim LightCycler auch ein Produktinachweis über sequenzspezifische Sonden möglich. Nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) ist bei Nutzung von zwei entsprechend modifizierten Oligonukleotiden, die als Hybridisierungssonden verwendet werden, eine sequenzspezifische Detektion von PCR-Produkten möglich (Wittwer et al., 1997). Bei dieser Methode binden die beiden Oligonukleotide nebeneinander ("head-to-tail") während der Annealingphase der PCR innerhalb der amplifizierten Sequenz. Die 5'-Sonde ist mit Fluorescein am 3'-Ende modifiziert, während die 3-Sonde LightCycler-Red 640 am 5'-Ende trägt. So kann ein Signal nach geeigneter Beleuchtung erhalten werden, da das Licht das Fluorophor der ersten Sonde (Fluorescein) anregt. Ein Teil der absorbierten Energie wird auf die zweite Sonde übertragen. Diese Energie regt wiederum das LightCycler-Red 640 an, was danach ein messbares Lichtsignal einer längeren Wellenlänge aussendet. Obwohl diese Methode eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität aufweist (Eckert et al., 2000), ist die Herstellung der Sonden problematisch. Es müssen für jedes Template spezifische Sonden entworfen und synthetisiert werden. Dies ist mit hohen Kosten und großem experimentellen Aufwand für das Testen und Optimieren der Sonden verbunden (Morrison et al., 1998; Steuerwald et al., 1999). Oft müssen mehrere Sondenpaare getestet werden, bevor ein geeignetes Paar gefunden wird. 15
- [0015] Der LightCycler ist, über eine kinetische Analyse der PCR, zur Quantifizierung von DNA geeignet. Für eine Quantifizierung von Bakterien oder zur Quantifizierung von DNA in biologischen Proben, die PCR-Inhibitoren enthalten können, eignet sich diese Verfahren jedoch nicht, da es nicht auf kompetitiver PCR beruht, und damit gegenüber Probenverunreinigungen empfindlich ist (Rupf et al. 2001, s. o.). Kompetitive PCR auf dem LightCycler bei kinetischer Quantifizierung der Produkte ist prinzipiell möglich, erfordert aber den Einsatz von zwei Paaren von Hybridisierungssonden und eine Optimierung der Analytik hinsichtlich beider Sondenpaare. Dies ist teuer und extrem zeitaufwendig. Wohl deshalb wurden bisher keine quantitativen competitiven PCRs auf dem LightCycler publiziert. 20
- [0016] Die Erfindung hat das Ziel, eine einfache, schnelle und kostengünstige Methodik anzugeben, nach der Eubakterien, deren DNA oder RNA auf dem LightCycler sicher, d. h. auch in biologischen Proben, die PCR-Inhibitoren enthalten können, quantitativ bestimmt werden können. 25
- [0017] Die Aufgabe ist darin zu sehen, in Ausgangsproben völlig unterschiedlicher Herkunft, zum Beispiel in humanem Gewebe, in Blut, in Sputum, in Speichel aber auch in Lebensmitteln (z. B. Bier), Abwasser, Kompostabluft und der gleichen nach eventueller Aufreinigung der Proben Eubakterien mit Hilfe der "real time"-PCR-Technologie quantitativ zu bestimmen. Die Bestimmung soll schnell erfolgen, Hybridisierungssonden nicht erforderlich sein. 30
- [0018] Dabei soll eine Gesamtbestimmung der Bakterien ebenso möglich sein wie der Einzelnachweis und die entsprechende Bestimmung einzelner Bakterienspezies. Jedermann soll den Bakterientest durchführen können, unabhängig von der Pathogenität der nachzuweisenden Erreger. 35
- [0019] Die Aufgabe wird erfundungsgemäß dadurch gelöst, daß wie folgt verfahren wird.
- [0020] Von den verschiedenen methodischen Varianten der quantitativen PCR wird die kompetitive qPCR mit heterologem inneren Standard als Grundlage gewählt. Eine solche qPCR-Methode wird zur Bestimmung der Gesamtbakterienzahl verwendet (Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien in ihrer Summe). Dazu werden zu hochkonservierten Teilsequenzen in den 16S rRNA-Genen von Eubakterien zwei komplementäre PCR-Primer (Vorwärts- und Rückwärts-Primer) synthetisiert. Mit diesen Primern ist ein PCR-Nachweis von Eubakterien unterschiedlicher Spezies möglich (Rupf et al., 1999a). Dagegen werden mit Archae-Bakterien und Eukaryonten keine Amplifikate erhalten. Zur Gewinnung des heterologen Kompetitors wird eine eukaryontische DNA-Sequenz, die den 16S rDNA-Sequenzen völlig unähnlich ist und einen um 2-3°C vom Schmelzpunkt der Amplifikate der Eubakterien-DNA verschiedenen Schmelzpunkt aufweist, so in die Multikloningstelle eines geeigneten Plasmids kloniert, daß flankierend leicht die Bindungsstellen für die zur Amplifizierung der bakteriellen DNA verwendeten Primer eingebaut werden können. Dies geschieht, indem vor bzw. hinter dem eukaryontischen Insert durch Verdau mit jeweils zwei Restriktionsenzymen, die im Plasmid nur einmal schneiden, das Plasmid geöffnet wird und nacheinander jeweils ein Hybrid aus Primer und komplementärem Primer, verlängert um die Basen, die die aus den Restriktionsverdau resultierenden Basenüberhänge ausfüllen und jeweils 5'-seitig phosphoryliert, gerichtet einkloniert wird. Mit Hilfe von M13-Primern, die außerhalb der einklonierten Primerbindungsstellen binden, kann mittels PCR unter Verwendung dieser Plasmide Kompetitor-DNA hergestellt werden, die z. B. durch UV-Spektrometrie, quantifiziert werden kann. Die Konstruktion dieser Kompetitoren ist beispielhaft für die Kompetitoren für die Quantifizierung von Eubakterien und von Streptococcus mutans in Abb. 1 dargestellt. 45
- [0021] Bei Zugabe bekannter Mengen dieses Kompetitors zu bakterienhaltigen Proben oder Proben, die Bakterien-DNA oder mittels reverser Transkriptase aus bakterieller Total-RNA erzeugte cDNA enthalten, und anschließender PCR mit dem Vorwärts- und dem Rückwärts-Primer wird ein Amplifikatgemisch erhalten, dessen Zusammensetzung aus PCR-Produkt von Bakterien-DNA und PCR-Produkt vom Kompetitor proportional zum Verhältnis der Moleküle von Bakterien-DNA und Kompetitor in der Probe ist. Nach Erstellen von Eichkurven, bei denen bekannte Mengen des Kompetitors gegen eine jeweils konstante, bekannte Anzahl von Bakterien-DNA oder Bakterienzellen titriert wird, kann aus dem für eine unbekannte Probe ermittelten Mengenverhältnis von Proben- und Kompetitor-Amplifikat und der bekannt- 50
- 60
- 65

DE 101 32 147 A 1

ten Menge zugesetzten Kompetitors die in der Probe vorhandene Anzahl von Bakterien-DNA-Molekülen bzw. Bakterienzellen bestimmt werden. Da die DNA-Menge pro Zelle konstant ist und die mittlere Kopienzahl der 16S rDNA-Gene von Eubakterien bekannt ist (3,6; Klappenbach et al., 2001), erlaubt das Ergebnis eine Ermittlung der Zellzahl auch komplexer Bakteriengemische, die in ihrer Genauigkeit von keiner bekannten Methode übertroffen wird.

- 5 [0022] Die Bestimmung der Mengenverhältnisse der bei der kompetitiven "real time"-PCR erhaltenen PCR-Produkte von Bakterien- und Kompetitor-DNA erfolgt erfahrungsgemäß durch die Ermittlung der Flächenverhältnisse der Peaks, die bei der der PCR folgenden Schmelzkurvenanalyse erhalten werden. Die Peakflächen werden mit der Geräteinternen Software des LightCyclers ermittelt, können nach Export der Schmelzkurvendatenliste aber auch mit jeder anderen, zur Integration von Flächen unter Kurven geeigneten Software (z. B. Excel Microsoft) oder Peakfit (Jandel Scientific)) bestimmt werden. Die Bestimmung der Mengenverhältnisse der bei der kompetitiven "real time"-PCR erhaltenen PCR-Produkte aus dem Flächenverhältnis der Schmelzkurvenpeaks ist neu, da vom Gerätehersteller (Roche Diagnostics) die Schmelzkurvenanalyse ausschließlich zur qualitativen Charakterisierung der PCR-Produkte (Ermittlung der Temperatur, bei dem die Schmelzkurven ihr Maximum haben = "Schmelzpunkt" der Amplifikate) empfohlen wird. Eine quantitative Analyse der Schmelzkurven wird von Roche Diagnostics nicht empfohlen, weil nicht für sinnvoll erachtet. Die Ursache dafür liegt in dem Umstand begründet, daß, obgleich die Schmelzkurven aus der ersten Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur entstehen und dementsprechend die Peakfläche eines Amplifikates zu seiner Menge proportional ist, die Fläche des Schmelzkurvenpeaks von PCR-Ansatz zu PCR-Ansatz auch bei bestmöglichster Kontrolle der Reaktionsbedingungen nicht reproduzierbar ist. Die Erfindung geht davon aus, daß demgegenüber in ein und demselben PCR-Ansatz das Verhältnis der Menge von zwei Amplifikaten (Proben-DNA und Kompetitor-DNA) mit hinreichend unterschiedlichem Schmelzpunkt proportional zum Verhältnis der Peakflächen der Schmelzkurven der Amplifikate sein sollte. Das Verhältnis der Peakflächen der Schmelzkurven der Amplifikate ist leicht durch Integration der Schmelzkurvenpeaks zu ermitteln. Um die Bakterienzahl bzw. die Menge bakterieller DNA in unbekannten Proben ermitteln zu können ist es somit nötig, Eichdaten zu gewinnen, die den Zusammenhang von Peakflächenverhältnis der Amplifikate von Kompetitor- und Proben-DNA und initialem Verhältnis der Template-DNA-Mengen von Kompetitor und Proben-DNA über einen weiten Bereich bekannter Proben-DNA-Mengen wiedergeben. Dazu werden bekannte Mengen bakterieller DNA mit Verdünnungsreihen des eubakterienspezifischen Kompetitors koamplifiziert und die Schmelzkurvenpeakverhältnisse der Amplifikate bestimmt. Aus den logarithmisch aufgetragenen Eichdaten ($\log(\text{Kompetitor-DNA})/(\text{Proben-DNA})$) gegen $\log(\text{Kompetitoramplifikatpeakfläche}/\text{Probenamplifikatpeakfläche})$) wird mittels linearer Regression (z. B. mittels Excel (Microsoft) oder SigmaPlot (Jandel Scientific)) an die Gleichung

$$30 \log(\text{Kompetitor-DNA})/(\text{Proben-DNA}) = n \log(\text{Kompetitoramplifikatpeakfläche}/\text{Probenamplifikatpeakfläche}) - k$$

[0023] (Bestimmung der Parameter n und k) eine Eichkurve erhalten. Nun kann der DNA-Gehalt unbekannter, experimentell identisch behandelter Proben wie folgt berechnet werden:

- 35 Moleküle Proben = DNA = $10^{n \log(\text{Moleküle Kompetitor-DNA}) + k - n \log(\text{Kompetitoramplifikatpeakfläche}/\text{Probenamplifikatpeakfläche})}$

- 40 [0024] Die quantitative Bestimmung einzelner Bakterienspezies erfolgt mit analogen Methoden der kompetitiven PCR. Abweichend zum obigen Vorgehen werden dabei durch Datenbankanalyse gerade speziespezifische Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen des jeweiligen Bakteriums gesucht und zwei dazu komplementäre PCR-Primer (Vorwärts- und Rückwärts-Primer) synthetisiert. Die Spezifität dieser Primer wird in PCR überprüft, die PCR-Bedingungen entsprechend optimiert.

- 45 [0025] Der Schmelzpunkt des bakterienspezifischen PCR-Produktes wird so gewählt, daß er 2–3°C verschieden von dem des bereits für die Bestimmung der Gesamtbakterienzahl synthetisierten Kompetitors ist. Dieser kann dann nach Einklonieren der Bindungsstellen für die bei der speziespezifischen PCR verwendeten Primer als bakterienspezifischer Kompetitor verwendet werden (siehe Abb. 1). Dieses Vorgehen wird bevorzugt, da so mit geringstem Aufwand speziespezifische Kompetitoren gewonnen werden können. Wenn die Schmelzpunkte von bakterienspezifischem PCR-Produkt und dem für die Gesamtbakterienbestimmung verwendeten heterologen Kompetitor näher als 2°C beieinander liegen muß ein neuer heterologer Kompetitor entworfen und synthetisiert werden, der eine andere, eukaryontische oder prokaryontische, von der des Zielbakteriums verschiedene, DNA-Sequenz enthält, deren Schmelzpunkt 2–3°C verschieden von dem des speziespezifischen PCR-Produktes ist. Die Synthese von Plasmiden, die als Template für die Synthese des heterologen Kompetitors dienen geschieht analog zu dem für die Gesamtbakterienbestimmung beschriebenen Verfahren mit dem Unterschied, daß die Bindungsstellen für die bei der speziespezifischen PCR verwendeten Primer einkloniert werden.

- 55 [0026] Mit Hilfe von M13-Primern, die außerhalb der einklonierten Primerbindungsstellen binden, kann mittels PCR unter Verwendung dieser Plasmide speziespezifische Kompetitor-DNA hergestellt werden, die z. B. durch UV-Spektrometrie, quantifiziert werden kann. Bei Zugabe bekannter Mengen dieses Kompetitors zu bakterienhaltigen Proben und anschließender PCR mit dem Vorwärts- und dem Rückwärts-Primer wird ein Amplifikatgemisch erhalten, dessen Zusammensetzung aus PCR-Produkt von Bakterien-DNA und PCR-Produkt vom Kompetitor proportional zum Verhältnis der Moleküle von Bakterien-DNA und Kompetitor in der Probe ist. Nach Erstellen von Eichkurven, bei denen bekannte Mengen des Kompetitors gegen eine jeweils konstante, bekannte Anzahl von Zellen der jeweiligen Bakterienspezies titriert wird, kann aus dem für eine unbekannte Probe ermittelten Mengenverhältnis von Proben- und Kompetitor-Amplifikat und der bekannten Menge zugesetzten Kompetitors die in der Probe vorhandene Bakterienzahl dieser Spezies bestimmt werden, da die DNA-Menge pro Zelle konstant ist und die Kopienzahl der 16S rRNA-Gene für viele Eubakterienspezies exakt bekannt ist. Für den Fall, daß die Kopienzahl der 16S rRNA-Gene für die gegebene Bakterienspezies nicht bekannt ist, wird der Mittelwert von 3,6 angenommen. Dies erlaubt eine Ermittlung der Zellzahl der Bakterienspezies, die in ihrer Genauigkeit von keiner bekannten Methode übertroffen wird.

- [0027] Die Bestimmung der Mengenverhältnisse der bei der "real time"-PCR erhaltenen PCR-Produkte von Bakterien-

DE 101 32 147 A 1

und Kompetitor-DNA erfolgt analog zu dem für die Gesamtbakterienbestimmung beschriebenen Verfahren durch die Ermittlung der Flächenverhältnisse der Peaks, die bei der der PCR folgenden Schmelzkurvenanalyse erhalten werden. Zur Erstellung von Eichkurven werden bekannte Mengen DNA der jeweiligen Spezies mit Verdünnungsreihen des spezies-spezifischen Kompetitors koamplifiziert und die Schmelzkurvenpeakverhältnisse der Amplifikate bestimmt. Aus den logarithmisch aufgetragenen Eichdaten ($\log(\text{Kompetitor-DNA}) / (\text{Proben-DNA})$) gegen $\log(\text{Kompetitoramplifikatpeakfläche} / \text{Probenamplifikatpeakfläche})$) werden, wie oben für Eubakterien beschrieben, die Parameter n und k erhalten. Nun kann der Gehalt an Bakterien der jeweiligen Spezies, bzw. deren DNA, in unbekannten, experimentell identisch behandelten Proben, ebenfalls analog zur oben beschriebenen Methode für Eubakterien, ermittelt werden.

5

[0028] Spezies spezifische Methoden der kompetitiven "real-time"-PCR wurden bisher für mehrere zahn- und zahnbetterkrankungsrelevante pathogene Bakterien entwickelt. Sie eignen sich jedoch prinzipiell zur Quantifizierung aller Eubakterien, für die 16S rRNA-Gensequenzen bekannt sind.

10

[0029] Im folgenden wird das erfundungsgemäße Verfahren in Ausführungsbeispielen erläutert.

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien in ihrer Summe

15

Vorwärtsprimer (Eubactfo): ACTACGTGCCAGCAGCC

Rückwärtsprimer (Eubactre): GGACTACCAGGGTATCTAATCC

Oligonukleotid 1: AATTACTACGTGCCAGCAGCGTAC

Oligonukleotid 2: GGCTGCTGGCACGTAGT

Oligonukleotid 3: AGCTGGACTACCAGGTATCTAACCTGCA

20

Oligonukleotid 4: GGATTAGATACCCCTGGTAGTCC

M13-Vorwärtsprimer (M13fo): GTAAAACGACGCCAGT

M13-Rückwärtsprimer (M13re): AACAGCTATGACCATGA

1.1. Synthese des heterologen Kompetitors

25

[0030] Zur Herstellung des heterologen Kompetitors muß eine DNA ausgewählt werden, die einen deutlich (um 2–3°C) anderen Schmelzpunkt als die PCR-Produkte der Ziel-DNAs der Bakterien besitzt. Um diesen Kompetitor problemlos auch für die Quantifizierung anderer Prokaryonten einsetzen zu können, bietet es sich an, eine eukaryontische DNA-Sequenz zu wählen. Ein cDNA-Fragment der Menschenleber-Fruktose-1,6-bisphosphatase cDNA (228 Bp), das in dem Vektor pGEM-T (Promega) kloniert vorliegt (Plasmid pHmfbp), wird für diesen Zweck verwendet. Um diese DNA als Template für die Synthese des Kompetitors benutzen zu können, müssen zunächst die Sequenzen der Primer, die zur Amplifizierung der bakteriellen Ziel-DNAs dienen, an 5'- und 3'-seitig des Menschenleber-FBPase-cDNA-Fragments in den Vektor gerichtet eingebaut werden. Um die Bindungsstelle des Vorwärtsprimers einzubauen wird das Plasmid mit den Restriktionsenzymen EcoRI und KpnI geschnitten und dephosphoryliert, während zwei Oligonukleotide, von denen eines dem Vorwärtsprimer entspricht, der 5'-seitig um die durch EcoRI und 3'-seitig um die durch KpnI erzeugten 4-Basen-Überhänge verlängert wurde (Oligonukleotid1), das andere zum Vorwärtsprimer komplementär ist (Oligonukleotid2), phosphoryliert und hybridisiert werden. Es folgt eine Ligation des linearisierten Plasmids mit dem Oligonukleotidhybrid unter Verwendung von T4-DNA-Ligase. Die Bindungsstelle des Rückwärtsprimers wird nach dem Verdau des zuvor erhaltenen Plasmids mit PstI und Hind III mittels der gleichen Methode eingebaut (Oligonukleotide 3 und 4). Mit M13-Vorwärts- und -Rückwärtsprimer wird im Blockthermocycler eine PCR unter Verwendung des so gewonnenen Plasmids pLCCEubact, dessen Sequenz vorher mittels DNA-Sequenzierung überprüft wurde, als Template durchgeführt. Die Klonierungsstrategie ist in **Abb. 1**, linker Teil, dargestellt.

30

[0031] Reaktionsbedingungen:

35

Ansatzvolumen: 50 µl

45

Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz

dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz

Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz

Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

50

Template: 1 ng pLCCEubact

Taq-Polymerase: 1,25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil: initiale Denaturierung: 10 min 95°C

Zyklen:

55

Denaturierung: 1 min 95°C

Annealing: 1 min. 55°C

Extension: 1 min 72°C

Anzahl: 35

Final Extension: 10 min 72°C

60

[0032] Nach Reinigung mittels PCR-Purification-Kit (Qiagen) und analytischer Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromidanfärbung und Durchlichtfluoreszenzkontrolle der Homogenität und des Molekulargewichtes des PCR-Produktes wird die DNA-Konzentration des Kompetitors durch Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt.

1.2. Synthese der Standard-Proben-DNA

65

[0033] Zur Herstellung der Standard-Proben-DNA wird mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsprimer und unter Verwendung von Escherichia coli-DNA im Blockthermocycler eine PCR durchgeführt.

[0034] Reaktionsbedingungen:

DE 101 32 147 A 1

- Ansatzvolumen: 50 µl
Primerkonzentration: je 40 µmol/Ansatz
dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz
Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz
5 Puffer: 5 µl 10× Taq-Puffer
Template: 1 ng E. coli DNA
Taq-Polymerase: 1.25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)
Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)
Temperaturprofil: initiale Denaturierung: 10 min 95°C
10 Zyklen:
Denaturierung: 1 min 95°C
Annealing und Extension: 1 min 66°C
Anzahl: 35
Final Extension: 10 min 66°C
15 [0035] Das PCR-Produkt wird in pGEM-T (Promega) kloniert. Mit M13-Vorwärts- und -Rückwärtsprimer wird im Blockthermocycler eine PCR unter Verwendung des so gewonnenen Plasmids pEubact, dessen Sequenz vorher mittels DNA-Sequenzierung überprüft wurde, als Template durchgeführt.

Reaktionsbedingungen: wie unter 1.1

- 20 [0036] Nach Reinigung mittels PCR-Purification-Kit (Qiagen) und analytischer Agarosegelektrophorese mit Ethidiumbromidanfärbung und Durchlichtfluoreszenzkontrolle der Homogenität und des Molekulargewichtes des PCR-Produktes wird die DNA-Konzentration der Standard-Proben-DNA durch Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt.

25 1.3. Ermittlung einer Eichkurve

- [0037] Um Eichkurven zu erhalten werden im LightCycler Serien von PCRs unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärtsprimer durchgeführt, bei denen jeweils bekannte Mengen Standard-Proben-DNA mit unterschiedlichen bekannten Mengen des Kompetitors in Gegenwart von SYBR Green I koamplifiziert werden.
30 [0038] Reaktionsbedingungen:
Ansatzvolumen: 20 µl
Primerkonzentration: je 0,5 µM
LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics): 2 µl
Magnesiumchlorid: 6 mM
35 Template: Kompetitor- und Standard-Proben DNA unterschiedliche, bekannte Mengen: 2-4 µl
Taq-Polymerase: 1.25 U Ampli-Taq (Applied Biosystems)
Thermocycler: LightCycler (Roche Diagnostics)
Temperaturprofil: initiale Denaturierung: 0 Sek. 94°C
40 Zyklen:
Denaturierung: 0 Sek. 94°C
Annealing: 10 Sek. 55°C
Extension: 20 Sek. 72°C
Temperature transition: 20°C/Sek.
45 Anzahl: 45

1.4. Analyse der PCR-Produkte

- 50 [0039] Die Schmelzkurvenanalyse erfolgt mittels kontinuierlicher Fluoreszenzmessung zwischen 65 und 94°C bei einer Transitionsrate von 0,1°C/Sekunde. Die Schmelzkurvenmaxima dienen der Identifizierung der Peaks der Amplifikate von Kompetitor (85,5°C) und Standard-Proben-DNA (88,5°C). Die Integration der Schmelzkurvenpeaks erfolgt mit Hilfe der LightCycler-Software.
[0040] Die Flächen der Peaks der Amplifikate von Kompetitor und Standard-Proben-DNA werden durcheinander dividiert.

55 1.5. Erstellen der Eichkurven

- [0041] Logarithmische Auftragung der Eichdaten ($\log(\text{Kompetitor-DNA})/(\text{Proben-DNA})$) gegen $\log(\text{Kompetitoramplifikatpeakfläche}/\text{Probenamplifikatpeakfläche})$). Ein Beispiel ist in Abb. 2 gezeigt. Mittels linearer Regression an die Gleichung

$$\log(\text{Kompetitor-DNA})/(\text{Proben-DNA}) = n \log(\text{Kompetitoramplifikatpeakfläche}/\text{Probenamplifikatpeakfläche}) - k$$

erfolgte die Bestimmung der Parameter n und k, die zur Ermittlung der Eichgerade dienten.

65 1.6. Quantitative Bestimmung von Eubakterien

wie unter 1.3, aber anstelle der Standard-Proben-DNA 2 µl bakterienhaltige Probe.

DE 101 32 147 A 1

- [0042] Analyse der PCR-Produkte wie unter 1.4.
[0043] Ermittlung des Quotienten der Flächen der Schmelzkurvenpeaks der Amplifikate von Kompetitor und Bakterien-DNA nach Koamplifikation der Probe mit mehreren bekannten Kompetitormengen analog zu 1.5, jedoch unter Verwendung der Probe anstelle der Standard-Proben-DNA.
[0044] Ermittlung der Bakterien-DNA-Menge der Probe aus

5

$$\text{Moleküle Bakterien-DNA} = 10^{(\log(\text{Moleküle Kompetitor-DNA}) + k - n \log(\text{Kompetitoramplifikatpeakfläche}/\text{Probenamplifikatpeakfläche}))}$$

- [0045] Bildung des Mittelwertes aller auswertbaren (innerhalb der Eichkurve liegenden) Einzelergebnisse.
[0046] Ermittlung der Gesamtbakterienzahl durch Division des Ergebnisses durch 3,6 (mittlere Kopienzahl der 16S rRNA-Gene der Eubakterien).
[0047] Beispiel: Mit der zum Patent angemeldeten kompetitiven "real time"-PCR-Methodik wurde in Suspensionen zweier humarer Stuhlproben der totale Bakteriengehalt zu 2.4×10^9 und 0.7×10^9 Zellen/ml bestimmt. Mittels konventioneller kompetitiver PCR (nach Rupf et al., 1999a) wurden 3.4×10^9 und 1×10^9 Zellen/ml gefunden. Die Übereinstimmung der Ergebnisse ist befriedigend.

15

2. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies am Beispiel der Bestimmungsmethode für *Streptococcus mutans*

Vorwärtsprimer (Strmufo): GGTCAAGGAAAGTCTGGAGTAAAAGGCTA
Rückwärtsprimer (Strmure): CGCTTAGCTCCGGCACTAACGCC
Oligonukleotid 1: ATTGGTCAGGAAAGTCTGGAGTAAAAGGCTAGTAC
Oligonukleotid 2: TAGCCTTTACTCCAGACTTCCCTGACC
Oligonukleotid 3: AGCTGCCTAGCTCCGGCACTAACGCCTGCA
Oligonukleotid 4: GGCTTAGTGCCGGAGCTAACG
M13-Vorwärtsprimer (M13fo): GTAAAACGACGGCCAGT
M13-Rückwärtsprimer (M13re): AACAGCTATGACCATGA

20

2.1. Synthese des heterologen Kompetitors

30

- [0048] Zur Herstellung des heterologen Kompetitors werden in das Plasmid pHmf bp (siehe 1.1.) die Bindungsstellen der *S. mutans*-spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer eingebaut. Dabei wird wie unter 1.1. beschrieben vorgegangen. Es entsteht das Plasmid pLCCStrmu, dessen Sequenz mittels DNA-Sequenzierung überprüft wurde. Mit M13-Vorwärts- und Rückwärtsprimer und pLCCStrmu als Template wird eine PCR durchgeführt. Die Konstruktion des *S. mutans*-spezifischen Kompetitors ist in Abb. 1, rechter Teil, dargestellt.

35

Reaktionsbedingungen: wie unter 1.1

40

- [0049] Nach Reinigung mittels PCR-Purification-Kit (Qiagen) und analytischer Agarosegelektrophorese mit Ethidiumumbromidanfärbung und Durchlichtfluoreszenzkontrolle der Homogenität und des Molekulargewichtes des PCR-Produktes wird die DNA-Konzentration des Kompetitors durch Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt.

2.2. Synthese der Standard-Proben-DNA

- [0050] Zur Herstellung der Standard-Proben-DNA wird mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsprimer und unter Verwendung von *S. mutans*-DNA im Blockthermocycler eine PCR durchgeführt.

45

Reaktionsbedingungen: wie unter 1.2

- [0051] Das PCR-Produkt wird in pGEM-T (Promega) kloniert. Mit M13-Vorwärts- und -Rückwärtsprimer wird im Blockthermocycler eine PCR unter Verwendung des so gewonnenen Plasmids pStrmu, dessen Sequenz vorher mittels DNA-Sequenzierung überprüft wurde, als Template durchgeführt.

50

Reaktionsbedingungen: wie unter 1.1

55

- [0052] Nach Reinigung mittels PCR-Purification-Kit (Qiagen) und analytischer Agarosegelektrophorese mit Ethidiumumbromidanfärbung und Durchlichtfluoreszenzkontrolle der Homogenität und des Molekulargewichtes des PCR-Produktes wird die DNA-Konzentration der Standard-Proben-DNA durch Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt.

2.3. Ermittlung einer Eichkurve

60

- [0053] Um Eichkurven zu erhalten werden im LightCycler Serien von PCRs unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärtsprimer durchgeführt, bei denen jeweils bekannte Mengen Standard-Proben-DNA mit unterschiedlichen bekannten Mengen des Kompetitors in Gegenwart von SYBR-Green I koamplifiziert werden.

65

Reaktionsbedingungen: wie unter 1.3

- [0054] Abb. 3 zeigt beispielhaft die Schmelzkurven, die bei Koamplifikation gleicher Molekülzahlen (10^5) von für *S.*

DE 101 32 147 A 1

mutans-spezifischem Kompetitor und Standard-Proben-DNA erhalten wurden.

[0055] Es ist mit bloßem Auge zu erkennen (und wird durch Integration bestätigt), daß die Amplifikate von Kompetitor und Standard-Proben-DNA Peaks etwa gleicher Flächen liefern.

5

2.4. Analyse der PCR-Produkte

[0056] Die Schmelzkurvenanalyse erfolgt mittels kontinuierlicher Fluoreszenzmessung zwischen 65 und 94°C bei einer Transitionsrate von 0,1°C/Sekunde. Die Schmelzkurvenmaxima dienen der Identifizierung der Peaks der Amplifikate von Kompetitor (85,5°C) und Standard-Proben-DNA (89,5°C). Die Integration der Schmelzkurvenpeaks erfolgt mit Hilfe der LightCycler-Software.

10 [0057] Die Flächen der Peaks der Amplifikate von Kompetitor und Standard-Proben-DNA werden durcheinander dividiert.

2.5. Erstellen der Eichkurven

15

[0058] Logarithmische Auftragung der Eichdaten ($\log(\text{Kompetitor-DNA})/(\text{Proben-DNA})$) gegen $\log(\text{Kompetitoramplifikatpeakfläche}/\text{Probenamplifikatpeakfläche})$). Ein Beispiel ist in Abb. 4 gezeigt. Mittels linearer Regression an die Gleichung

20

$\log(\text{Kompetitor-DNA})/(\text{Proben-DNA}) = n \log(\text{Kompetitoramplifikatpeakfläche}/\text{Probenamplifikatpeakfläche}) - k$

erfolgte die Bestimmung der Parameter n und k, die zur Ermittlung der Eichgerade dienten.

2.6. Quantitative Bestimmung von Eubakterien

25

wie unter 2.3, aber anstelle der Standard-Proben-DNA 2 µl S. mutans-haltige Probe.

Analyse der PCR-Produkte wie unter 2.4

30

[0059] Ermittlung des Quotienten der Flächen der Schmelzkurvenpeaks der Amplifikate von Kompetitor und Bakterien-DNA nach Koamplifikation der Probe mit mehreren bekannten Kompetitormengen analog zu 2.5, jedoch unter Verwendung der Probe anstelle der Standard-Proben-DNA.

[0060] Ermittlung der S. mutans-DNA-Menge der Probe aus

35

Moleküle S. mutans-DNA = $10^{(\log(\text{Moleküle Kompetitor-DNA}) + k - n \log(\text{Kompetitoramplifikatpeakfläche}/\text{Probenamplifikatpeakfläche}))}$

[0061] Bildung des Mittelwertes aller auswertbaren (innerhalb der Eichkurve liegenden) Einzelergebnisse.

[0062] Ermittlung der S. mutans-Zellzahl durch Division des Ergebnisses durch 5 (Kopienzahl der 16S rRNA-Gene in S. mutans).

40

[0063] Beispiel: Tabelle 1 faßt die Ergebnisse der vergleichenden Quantifizierung von S. mutans Zellen in zwei verschiedenen Flüssigkulturen und drei verschiedenen humanen Speichelproben zusammen. Die Quantifizierung erfolgte mittels konventioneller kompetitiver S. mutans-spezifischer PCR (Rupp et al., 1999b), konventionelle "real time"-PCR mit kinetischer Analyse (ohne Kompetitor) und kompetitiver "real time"-PCR. Es ist zu erkennen, daß im Falle reinkultivierter Zellen alle drei Methoden gut übereinstimmende Ergebnisse liefern, während im Falle der Speichelproben nur die kompetitiven Methoden anwendbar sind, während die konventionelle "real time"-PCR versagt, wahrscheinlich wegen im Speichel vorhandener PCR-Inhibitoren. Die kompetitive "real time"-PCR ist dabei wesentlich schneller (Gesamtzeitbedarf 2,5 Std.) als die konventionelle kompetitive PCR (Gesamtzeitbedarf 8 Stunden).

3. Weitere Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies

50

[0064] Analog zu dem unter 2. beschriebenen Verfahren wurden speziespezifische Verfahren der Quantifizierung von DNA bzw. Zellen mittels kompetitiver "real time"-PCR für

Streptococcus sobrinus

Actinobacillus actinomycetemcomitans

55

Porphyromonas gingivalis

Prevotella intermedia

Eikenella corrodens

Fusobacterium nucleatum

Bacteroides forsythus

60

und

Treponema denticola
entwickelt.

DE 101 32 147 A 1

Tabelle 1

Quantifizierung von *S. mutans* mit Hilfe konventioneller kompetitiver PCR, konventioneller "real-time"-PCR (kinetische Analyse, ohne Kompetitor) und kompetitiver "real time" PCR; 3fache Bestimmung \pm Standardabweichung

Probe	<i>S. mutans</i> Zellen/ml		
	konventionelle kompetitive PCR	konventionelle "real time"-PCR mit kinetischer Analyse	kompetitive "real time"-PCR
Flüssigkultur (1)	$1.0 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$	$0.8 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$
Flüssigkultur (2)	$1.0 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^4$	$0.9 \times 10^5 \pm 2 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5 \pm 4 \times 10^4$
Speichel (1)	$1.2 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^5$	$2.1 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6 \pm 3.5 \times 10^5$
Speichel (2)	$2.3 \times 10^6 \pm 3 \times 10^5$	$1.4 \times 10^7 \pm 8 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6 \pm 7 \times 10^5$
Speichel (3)	$2.2 \times 10^6 \pm 1.7 \times 10^5$	$1.2 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$	$1.4 \times 10^6 \pm 5 \times 10^5$

Legende zu den Abbildungen

Abb. 1

[0065] Klonierungsstrategie zur Herstellung der heterologen Kompetitoren für die kompetitive "real time"-PCR. Eubactfo, Eubactre, Strmufo, Strmure: PCR-Primer (siehe Text); pHmfbp: Fragment der cDNA der Fruktose-1,6-bisphosphatase des menschlichen Muskels, kloniert in pGEM-T (Promega); fbp: 228 Bp-Fragment der cDNA der Muskel-Fruktose-1,6-bisphosphatase.

Abb. 2

[0066] Eichkurven der kompetitiven "real time" PCR zur Quantifizierung von Eubakterien in ihrer Summe. Verschiedene bekannte Mengen Proben-DNA wurden mit seriellen Verdünnungen der Kompetitor-DNA (heterologer, eubakterienspezifischer Kompetitor, siehe 1.1.) im LightCycler koamplifiziert. Logarithmisch sind das initiale Verhältnis von Kompetitor- zu Proben-DNA gegen das Verhältnis der Peakflächen der Amplifikate von Kompetitor und Probe aufgetragen. Mittels linearer Regression wurden die Parameter der unter 1.5. angegebenen Gleichung bestimmt: $n = 4,1$, $k = -1,54$.

Abb. 3

[0067] Schmelzkurven nach Koamplifikation gleicher molarer Mengen von Proben- und Kompetitor-DNA. 10^4 Moleküle *S. mutans*-spezifischer Kompetitor und *S. mutans*-Wildtyp 16S DNA wurden im LightCycler koamplifiziert. Schmelzkurvenpeaks des Probenamplifikates (A), des Kompetitoramplifikates (B) und von Primerdimeren in der Negativkontrolle (ohne Template) (C).

Abb. 4

[0068] Eichkurven der kompetitiven "real time" PCR zur Quantifizierung von *S. mutans* in ihrer Summe. Verschiedene bekannte Mengen Proben-DNA wurden mit seriellen Verdünnungen der Kompetitor-DNA (heterologer, *S. mutans*-spezifischer 111 Kompetitor, siehe 2.1.) im LightCycler koamplifiziert. Logarithmisch sind das initiale Verhältnis von Kompetitor- zu Proben-DNA gegen das Verhältnis der Peakflächen der Amplifikate von Kompetitor und Probe aufgetragen. Mittels linearer Regression wurden die Parameter der unter 2.5. angegebenen Gleichung bestimmt: $n = 2,6$, $k = -0,55$.

Literatur

Eckert, C., Landt, O., Tabe, T., Seeger, K., Beyermann, B., Proba, J. und Henze, G. (2000) Potential of LightCycler technology for quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 14, 316–323.

DE 101 32 147 A 1

- Klappenbach, J. A., P. R. Saxman, J. R. Cole und T. M. Schmidt (2001) rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.* 29: 181–184.
- Morrison, T. B., Weis, J. J. und Wittwer, C. T. (1998) Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR-Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24, 954–962.
- 5 Rupf, S., Merte, K. und Eschrich, K. (1999a) Quantification of Bacteria in Oral Samples by Competitive Polymerase Chain Reaction. *J. Dent. Res.* 78, 850–856.
- Rupf, S., Kneist, S., Merte, K. und Eschrich, K. (1999b) Quantitative determination of *Streptococcus mutans* by using competitive polymerase chain reaction. *Eur. J. Oral Sci.* 107, 75–81 (1999).
- 10 Steuerwald, N., Cohen, J., Herrera, R. J. und Brenner, C. A. (1999) Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol. Hum. Reprod.* 5 (11), 1034–1039.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. und Rasmussen, R. P. (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22, 130–138.

Patentansprüche

- 15 1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien in biologischen Proben mittels kompetitiver PCR unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärts-Primern, die an in Eubakterien-DNA vorkommende Teilsequenzen binden, und für die PCR erforderlichen Hilfs- und Nebenstoffen, einschließlich eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, dadurch gekennzeichnet, daß
- 20 die Kompetitor-DNA in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von M13 Vorwärts- und Rückwärtsprimer und einem Template, das in einem Plasmid eine eukaryotische Basensequenz, deren Schmelztemperatur um 2–3°C von der des Amplifikates der Eubakterien-DNA verschieden ist, enthält, die von den Bindungsstellen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers flankiert wird, erzeugt wird,
der Ansatz einschließlich der biologischen Probe wiederholt einem Temperaturregime unterworfen wird
25 und das Mengenverhältnis der Amplifikate von Probe und Kompetitor aus dem Verhältnis der mittels Integration erhaltenen Peakflächen der Schmelzkurven ermittelt wird,
und anschließend aus Eichkurven, die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wurden, indem bekannte Mengen der Proben-DNA mit verschiedenen, bekannten Mengen des Kompetitors koamplifiziert wurden, und der Logarithmus des Peakflächenverhältnisses von Probe und Kompetitor gegen den Logarithmus des Molekülzahlverhältnisses von Probe und Kompetitor aufgetragen wurde, aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Molekülzahl des zum PCR-Ansatz zugegebenen Kompetitors die DNA-Molekülzahl der Probe, und daraus unter Berücksichtigung der Anzahl der Proben-DNA-Kopien je Bakterienzelle die Anzahl der Bakterienzellen ermittelt wird.
- 30 2. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien in ihrer Summe in biologischen Proben mittels kompetitiver PCR unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärts-Primern, die an in Eubakterien-DNA hochkonserveierte Teilsequenzen der 16S rDNA binden, und für die PCR erforderlichen Hilfs- und Nebenstoffen, einschließlich eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß
die Kompetitor-DNA in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von M13 Vorwärts- und Rückwärtsprimer und einem Template, das in einem Plasmid eine eukaryotische Basensequenz, deren Schmelztemperatur um 2–3°C von der des Amplifikates der Eubakterien-DNA verschieden ist, enthält, die von den Bindungsstellen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers flankiert wird, erzeugt wird,
der Ansatz einschließlich der biologischen Probe wiederholt einem Temperaturregime unterworfen wird
35 und das Mengenverhältnis der Amplifikate von Probe und Kompetitor aus dem Verhältnis der mittels Integration erhaltenen Peakflächen der Schmelzkurven ermittelt wird,
und anschließend aus Eichkurven, die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wurden, indem bekannte Mengen eines mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsprimer und mit *E. coli* DNA als Template erhaltenen Amplifikates mit verschiedenen, bekannten Mengen des Kompetitors koamplifiziert wurden, und der Logarithmus des Peakflächenverhältnisses von Probe und Kompetitor gegen den Logarithmus des Molekülzahlverhältnisses von Probe und Kompetitor aufgetragen wurde, aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Molekülzahl des zum PCR-Ansatz zugegebenen Kompetitors die DNA-Molekülzahl der Probe, und daraus unter Berücksichtigung der mittleren Anzahl der 16S rDNA-Kopien je Bakterienzelle (3, 6) die Anzahl der Bakterienzellen ermittelt wird.
- 40 3. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies in biologischen Proben mittels kompetitiver PCR unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärts-Primern, die an für diese Spezies spezifische Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden, und für die PCR erforderlichen Hilfs- und Nebenstoffen, einschließlich eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß
die Kompetitor-DNA in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von M13 Vorwärts- und Rückwärtsprimer und einem Template, das in einem Plasmid eine eukaryotische Basensequenz, deren Schmelztemperatur um 2–3°C von der des Amplifikates der DNA dieser Spezies verschieden ist, enthält, die von den Bindungsstellen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers flankiert wird, erzeugt wird,
der Ansatz einschließlich der biologischen Probe wiederholt einem Temperaturregime unterworfen wird
45 und das Mengenverhältnis der Amplifikate von Probe und Kompetitor aus dem Verhältnis der mittels Integration erhaltenen Peakflächen der Schmelzkurven ermittelt wird,
und anschließend aus Eichkurven, die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wurden, indem bekannte Mengen eines mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsprimer und mit genetischer DNA der Bakterienspezies als Template erhaltenen Amplifikates mit verschiedenen, bekannten Mengen des Kompetitors koamplifiziert wurden, und der Logarithmus des Peakflächenverhältnisses von Probe und Kompetitor gegen den Logarithmus des Molekülzahlverhältnisses von Probe und Kompetitor aufgetragen wurde, aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentra-
- 50
- 55
- 60
- 65

DE 101 32 147 A 1

tionen und der bekannten Molekülzahl des zum PCR-Ansatz zugegebenen Kompetitors die DNA-Molekülzahl der Probe, und daraus unter Berücksichtigung der Anzahl der 16S rDNA-Kopien je Bakterienzelle dieser Spezies (falls unbekannt unter Annahme der mittleren Anzahl von 16S rDNA-Kopien in Eubakterien = 3, 6) die Anzahl der Bakterienzellen ermittelt wird.

4. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *Streptococcus mutans* in biologischen Proben mittels kompetitiver PCR unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärts-Primern, die an für *Streptococcus mutans* spezifische Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden, und für die PCR erforderlichen Hilfs- und Nebenstoffen, einschließlich eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, dadurch gekennzeichnet, daß

5

die Kompetitor-DNA in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von M13 Vorwärts- und Rückwärtsprimer und einem Template, das in einem Plasmid eine eukaryontische Basensequenz, deren Schmelztemperatur um 3°C niedriger als die des Amplifikates der *Streptococcus mutans*-DNA ist, enthält, die von den Bindungsstellen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers flankiert wird, erzeugt wird, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 45 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 0 Sek. 94°C, Denaturierung: 0 Sek. 94°C, Annealing: 10 Sek. 55°C, Extension: 20 Sek. 72°C, Fluoreszenzmessung bei 72°C, Schmelzkurvenanalyse zwischen 65 und 94°C, Transitionrate 0,1°C/Sek.

10

und das Mengenverhältnis der Amplifikate von Probe und Kompetitor aus dem Verhältnis der mittels Integration erhaltenen Peakflächen der Schmelzkurven ermittelt wird,

15

und anschließend aus Eichkurven, die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wurden, indem bekannte Mengen eines mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsprimer und mit genomischer DNA aus *Streptococcus mutans* als Template erhaltenen Amplifikates mit verschiedenen, bekannten Mengen des Kompetitors koamplifiziert wurden, und der Logarithmus des Peakflächenverhältnisses von Probe und Kompetitor gegen den Logarithmus des Molekülzahlverhältnisses von Probe und Kompetitor aufgetragen wurde, aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Molekülzahl des zum PCR-Ansatz zugegebenen Kompetitors die DNA-Molekülzahl der Probe, und daraus unter Berücksichtigung der Anzahl von 5 16S rDNA-Kopien je *Streptococcus mutans*-Zelle die Anzahl der *Streptococcus mutans*-Zellen ermittelt wird.

20

5. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in biologischen Proben mittels kompetitiver PCR unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärts-Primern, die an für *Actinobacillus actinomycetemcomitans* spezifische Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden, und für die PCR erforderlichen Hilfs- und Nebenstoffen, einschließlich eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, dadurch gekennzeichnet, daß

25

die Kompetitor-DNA in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von M13 Vorwärts- und Rückwärtsprimer und einem Template, das in einem Plasmid eine eukaryontische Basensequenz, deren Schmelztemperatur um 3°C niedriger als die des Amplifikates der *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-DNA ist, enthält, die von den Bindungsstellen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers flankiert wird, erzeugt wird, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 45 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 0 Sek. 94°C, Denaturierung: 0 Sek. 94°C, Annealing: 10 Sek. 55°C, Extension: 20 Sek. 72°C, Fluoreszenzmessung bei 72°C, Schmelzkurvenanalyse zwischen 65 und 94°C, Transitionrate 0,1°C/Sek.

30

und das Mengenverhältnis der Amplifikate von Probe und Kompetitor aus dem Verhältnis der mittels Integration erhaltenen Peakflächen der Schmelzkurven ermittelt wird,

35

und anschließend aus Eichkurven, die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wurden, indem bekannte Mengen eines mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsprimer und mit genomischer DNA aus *Actinobacillus actinomycetemcomitans* als Template erhaltenen Amplifikates mit verschiedenen, bekannten Mengen des Kompetitors koamplifiziert wurden, und der Logarithmus des Peakflächenverhältnisses von Probe und Kompetitor gegen den Logarithmus des Molekülzahlverhältnisses von Probe und Kompetitor aufgetragen wurde, aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Molekülzahl des zum PCR-Ansatz zugegebenen Kompetitors die DNA-Molekülzahl der Probe, und daraus unter Berücksichtigung der Anzahl von 5,7 16S rDNA-Kopien je *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-Zelle die Anzahl der *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-Zellen ermittelt wird.

40

6. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *Porphyromonas gingivalis* in biologischen Proben mittels kompetitiver PCR unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärts-Primern, die an für *Porphyromonas gingivalis* spezifische Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden, und für die PCR erforderlichen Hilfs- und Nebenstoffen, einschließlich eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, dadurch gekennzeichnet, daß

45

die Kompetitor-DNA in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von M13 Vorwärts- und Rückwärtsprimer und einem Template, das in einem Plasmid eine eukaryontische Basensequenz, deren Schmelztemperatur um 3°C niedriger als die des Amplifikates der *Porphyromonas gingivalis*-DNA ist, enthält, die von den Bindungsstellen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers flankiert wird, erzeugt wird, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 45 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 0 Sek. 94°C, Denaturierung: 0 Sek. 94°C, Annealing: 10 Sek. 55°C, Extension: 20 Sek. 72°C, Fluoreszenzmessung bei 72°C, Schmelzkurvenanalyse zwischen 65 und 94°C, Transitionrate 0,1°C/Sek.

50

und das Mengenverhältnis der Amplifikate von Probe und Kompetitor aus dem Verhältnis der mittels Integration erhaltenen Peakflächen der Schmelzkurven ermittelt wird,

55

und anschließend aus Eichkurven, die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wurden, indem bekannte Mengen eines mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsprimer und mit genomischer DNA aus *Porphyromonas gingivalis* als Template erhaltenen Amplifikates mit verschiedenen, bekannten Mengen des Kompetitors koamplifiziert wurden, und der Logarithmus des Peakflächenverhältnisses von Probe und Kompetitor gegen den Logarithmus des Molekülzahlverhältnisses von Probe und Kompetitor aufgetragen wurde, aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Molekülzahl des zum PCR-Ansatz zugegebenen Kompetitors die DNA-Molekülzahl der Probe, und daraus unter Berücksichtigung der Anzahl von 5,3 16S rDNA-Kopien je *Porphyromonas gingivalis*-Zelle die Anzahl der *Porphyromonas gingivalis*-Zellen ermittelt wird.

60

und anschließend aus Eichkurven, die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wurden, indem bekannte Mengen eines mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsprimer und mit genomischer DNA aus *Porphyromonas gingivalis* als Template erhaltenen Amplifikates mit verschiedenen, bekannten Mengen des Kompetitors koamplifiziert wurden, und der Logarithmus des Peakflächenverhältnisses von Probe und Kompetitor gegen den Logarithmus des Molekülzahlverhältnisses von Probe und Kompetitor aufgetragen wurde, aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Molekülzahl des zum PCR-Ansatz zugegebenen Kompetitors die DNA-Molekülzahl der Probe, und daraus unter Berücksichtigung der Anzahl von 5,3 16S rDNA-Kopien je *Porphyromonas gingivalis*-Zelle die Anzahl der *Porphyromonas gingivalis*-Zellen ermittelt wird.

65

DE 101 32 147 A 1

7. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *Prevotella intermedia* in biologischen Proben mittels kompetitiver PCR unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärts-Primern, die an für *Prevotella intermedia* spezifische Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden, und für die PCR erforderlichen Hilfs- und Nebenstoffen, einschließlich eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, dadurch gekennzeichnet, daß
- 5 die Kompetitor-DNA in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von M13 Vorwärts- und Rückwärtsprimer und einem Template, das in einem Plasmid eine eukaryontische Basensequenz, deren Schmelztemperatur um 3°C niedriger als die des Amplifikates der *Prevotella intermedia*-DNA ist, enthält, die von den Bindungsstellen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers flankiert wird, erzeugt wird,
der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 45 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale
10 Denaturierung: 0 Sek. 94°C, Denaturierung: 0 Sek. 94°C, Annealing: 10 Sek. 55°C, Extension: 20 Sek. 72°C, Fluoreszenzmessung bei 72°C, Schmelzkurvenanalyse zwischen 65 und 94°C, Transitionsrate 0,1°C/Sek.
und das Mengenverhältnis der Amplifikate von Probe und Kompetitor aus dem Verhältnis der mittels Integration erhaltenen Peakflächen der Schmelzkurven ermittelt wird,
15 und anschließend aus Eichkurven, die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wurden, indem bekannte Mengen eines mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsprimer und mit genomicscher DNA aus *Prevotella intermedia* als Template erhaltenen Amplifikates mit verschiedenen, bekannten Mengen des Kompetitors koamplifiziert wurden, und der Logarithmus des Peakflächenverhältnisses von Probe und Kompetitor gegen den Logarithmus des Molekülzahlverhältnisses von Probe und Kompetitor aufgetragen wurde, aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Molekülzahl des zum PCR-Ansatz zugegebenen Kompetitors die DNA-Molekülzahl der Probe, und daraus unter Berücksichtigung der Anzahl von 5,3 16S rDNA-Kopien je *Prevotella intermedia*-Zelle die Anzahl der *Prevotella intermedia*-Zellen ermittelt wird.
- 20 8. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *Eikenella corrodens* in biologischen Proben mittels kompetitiver PCR unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärts-Primern, die an für *Eikenella corrodens* spezifische Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden, und für die PCR erforderlichen Hilfs- und Nebenstoffen, einschließlich eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, dadurch gekennzeichnet, daß
- 25 die Kompetitor-DNA in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von M13 Vorwärts- und Rückwärtsprimer und einem Template, das in einem Plasmid eine eukaryontische Basensequenz, deren Schmelztemperatur um 3°C niedriger als die des Amplifikates der *Eikenella corrodens*-DNA ist, enthält, die von den Bindungsstellen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers flankiert wird, erzeugt wird,
der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 45 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale
30 Denaturierung: 0 Sek. 94°C, Denaturierung: 0 Sek. 94°C, Annealing: 10 Sek. 55°C, Extension: 20 Sek. 72°C, Fluoreszenzmessung bei 72°C, Schmelzkurvenanalyse zwischen 65 und 94°C, Transitionsrate 0,1°C/Sek.
und das Mengenverhältnis der Amplifikate von Probe und Kompetitor aus dem Verhältnis der mittels Integration erhaltenen Peakflächen der Schmelzkurven ermittelt wird,
35 und anschließend aus Eichkurven, die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wurden, indem bekannte Mengen eines mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsprimer und mit genomicscher DNA aus *Eikenella corrodens* als Template erhaltenen Amplifikates mit verschiedenen, bekannten Mengen des Kompetitors koamplifiziert wurden, und der Logarithmus des Peakflächenverhältnisses von Probe und Kompetitor gegen den Logarithmus des Molekülzahlverhältnisses von Probe und Kompetitor aufgetragen wurde, aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Molekülzahl des zum PCR-Ansatz zugegebenen Kompetitors die DNA-Molekülzahl der Probe, und daraus unter Berücksichtigung der Anzahl von 4 16S rDNA-Kopien je *Eikenella corrodens*-Zelle die Anzahl der *Eikenella corrodens*-Zellen ermittelt wird.
- 40 9. Verfahren nach Anspruch 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Kompetitor eine 217 Bp lange Teilsequenz der humanen Muskel-Fruktose-1,6-bisphosphatase enthält, die blunt in SmaI/HincII-verdauten pUC18 kloniert wurde, und deren Schmelzpunkt bei 85,5°C liegt.

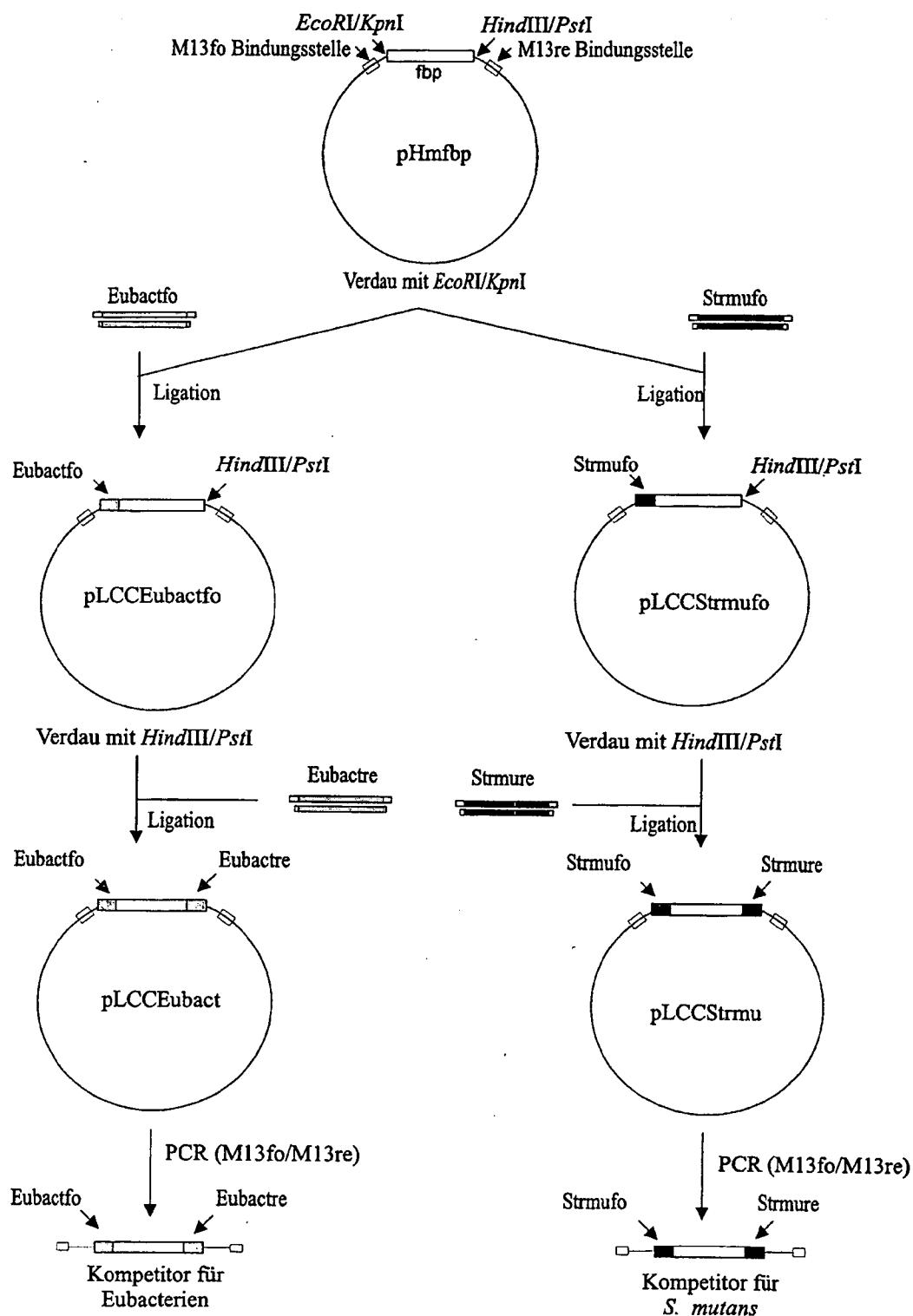
Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

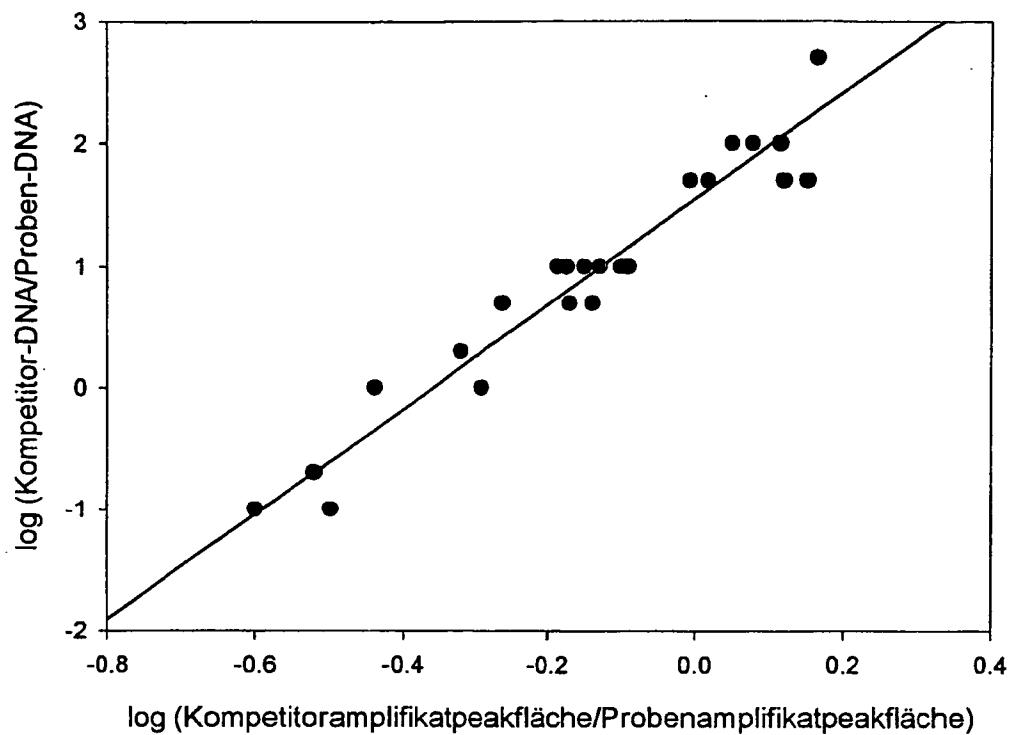
50

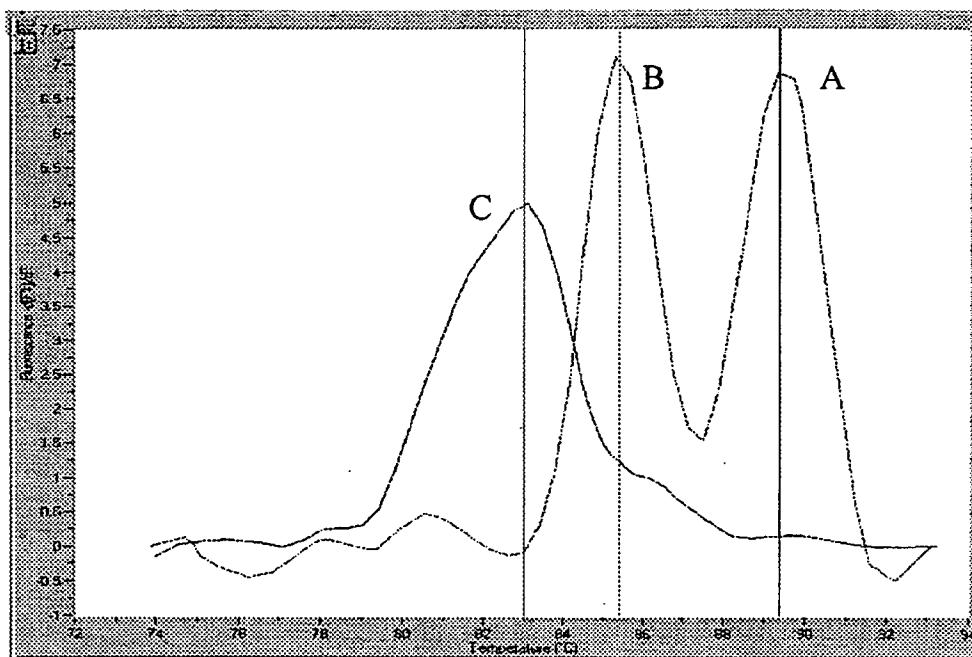
55

60

65







Schmelzkurven nach Koamplifikation gleicher molarer Mengen von Proben- und Kompetitor-DNA.

